茶樹酯酶同功酶與親緣相關之研究

蔡右任

摘　要

以青心烏龍、青心大冇、漢口及其雜交 F_1 後代，以及再與青心烏龍爲父本之雜交 F_2 後代，阿薩姆共 15 個品種系爲材料，分析其酯酶同功酶之電泳圖譜，藉以比較各種系間相似度。結果顯示電泳圖譜條帶分布有 16 條，各種系譜條帶分布有 9 至 13 條不等，基本酶譜帶有 8 條，Rf 分別爲 0.12 、0.38、0.40、0.47、0.50 、 0.52 、 0.59 、 0.63 ，出現頻度 86.7 % 以上，而 Rf 0.36 、 0.44 、 0.56 出現頻度在 73.3 至 53.3 % 之間，特有條帶 Rf 0.17 、0.33、 0.42 、0.45 、0.48 出現頻度則在 40 % 以下。

經聚類分析其相似度在 40 50˜ % 時，可分爲兩大類群，以青心烏龍爲父本之 F_2 代選育新品系及台茶 12 號爲一類群（Ⅰ），而青心烏龍、青心大冇、漢口及其雜交 F_1 後代爲另一類群（Ⅱ），並顯示以青心烏龍爲雜交父本之 F_2 代，其與青心烏龍、青心大冇、漢口的相似度在 30% 以下。

關鍵字：茶樹、酯同功酵素、親緣相關

臺灣省茶業改良場文山分場長

前　言

台灣茶樹品種約百餘種，其中包括野生茶樹、地方品系、引進品種、育成品種等 [5]，農藝性狀上有些品種並不容易區分 [16]，親緣相關性資料也缺乏，當進行雜交育種時，就育種目標在親本選擇上，只能從親本外觀性狀、生長狀況、適製茶類等相關資料去判別決定。而茶樹屬屢異交作物，遺傳行爲複雜，雜交後代變異極大，其與親本相似性如何？本試驗擬以同功異構酶作爲親緣相關指標，就本場現有品種及品系爲材料，進行同功異構酶分析。以瞭解親緣相關作爲育種時，親本選擇之依據。

長年作物雖能以型態差異如葉型、葉脈分支、茸毛、果實性狀等區分不同品種，但這些都可能受環境及栽培方式影響而改變 [9,16]。因此一種穩定且不易受其他因子影響的的遺傳指標工具是極重要的，同功異構酶已成功地被應用於各種作物，作爲品種鑑定指標 [1,3,14,15]。其中最多被分析作爲指標的同功異構酶有酯酶 (EST, Arylesterase EC-3.1.1.2)、麩胺酸草醯酸轉胺酶 (GOT, Glutamate-oxlaoace-tate transaminase EC-2.6.1.1)、蘋果酸去氫酶 (MDH, Malate dehydrogenase EC-1.1.1.37)、磷酸葡萄糖異構酶 (PGI, Phosphoglucose isomerase EC-5.3.1.9)、磷葡萄酸酶 (PGM, Phosphoglucomutase EC-2.7.5.1)、過氧化酶 (PRX, Per-oxidase EC-1.11.1.7)、莽草酸去氫酶 (SKDH, Shikimate dehydrogenase EC-1.1.1.25)、超氧歧化酶 (SOD, Superoxide dismutase EC-1.15.1.1) [1,2,3,6,7,8,9,10,11,12,13,17]。

以上同功異構經凝膠電泳染色後，呈現不同數目及距離的帶狀分佈異構酶圖譜 (zymogram)，分析這些圖譜的差異性，可鑑定親緣關係、品種純度、遺連鎖性等 [7,8,9,11]。本試驗擬就應用此方式對茶樹品種間差異進行分析，以連鎖群 (Linkage cluster) 估算各品種系間同功異構酶條帶的相似程度，確立品種系間的親緣關係。

材料與方法

一、試驗材料：

取樣來自同一生長條件下之文山分場品種園，計 15 個品種或品系，分類成兩類，進行分析比較。

1. 77 年選育部份發酵茶新品系：

   51-14,51-34,51-67,51-69,51-122（以青心烏龍爲父本之雜交後代）。

2. 父母本及對照品種部份：

台茶 12 號、青心大冇、青心烏龍、紅心烏龍、台茶 6 號、漢口、台農 8 號、台茶 13 號、大冇、阿薩姆。

二、分析方法：

⑴抽取方法：

採生長至 1 心 5 葉時的新梢，取第 4 葉 50 片分別清洗擦乾，以液態氮冷凍敲碎混合成一個樣品後，貯藏於 -20 ℃下備用。

稱取 0.3g 冷凍葉片樣品，置入陶瓷研缽中，加入 0.2g PVPP 防止樣品褐化，以液態氮研磨細碎後，加入 1.5ml 抽取緩衝液 (0.1M Tris-HCl ， pH 7.2 ， 10% Glycerol ， 0.02% 2-Mercaptoethanol)，再加以研磨均質混合。

倒入 2ml 微離心管中，以 10,000rpm ， -4 ℃下，離心 20 分鐘，取上層液再離心一次，取澄清液 500 μ l ，加入 10 μ l 含 0.1% bromophenol Blue 追蹤染色劑。

⑵電泳方法：

電泳以 Bio-Rad(PROTEIN Ⅱ xi) 垂直式聚丙烯醯胺膠體系統，膠體長×寬×厚 =200 × 200 × 1.5mm，依據 Shields et al.(1983)修改之方法 [14] ，分離膠濃度爲 10% ， pH 8.9 ，濃縮膠濃度爲 4.5% ， pH 6.7 ，上下電泳槽之緩衝液爲 0.85M Tris-Gly 。

每槽樣品量 90 μ l ，電泳於 0-4 ℃下，以起始電壓 100V ，電泳至分離膠電壓改爲 210V ，電泳至追蹤染色泳動至膠體底端 1.5 ㎝處即停止電泳，取出膠體進行染色。每個品種系樣品皆進行三重複抽取及電泳分析。

⑶酯同功酶染色方法：

酯酶 (EST,Arylesterase) 染色方法則依據 Vallejos 氏修改後之方法 [15] 。

稱取各 100mg 的 α -Napthyl acetate 及 β -Napthyl acetate 溶於 8ml 丙酮中。

稱取 Fast Blue RR Salt 200mg 溶於 200ml 磷酸緩衝液 (pH 6.2) 中。

染色前將兩溶液混合，將膠片浸於其中，於室溫黑暗下染色 8 小時。將染色後之膠片，以水：醋酸：酒精 (1.5:1.5:1) 混合液進行脫色。

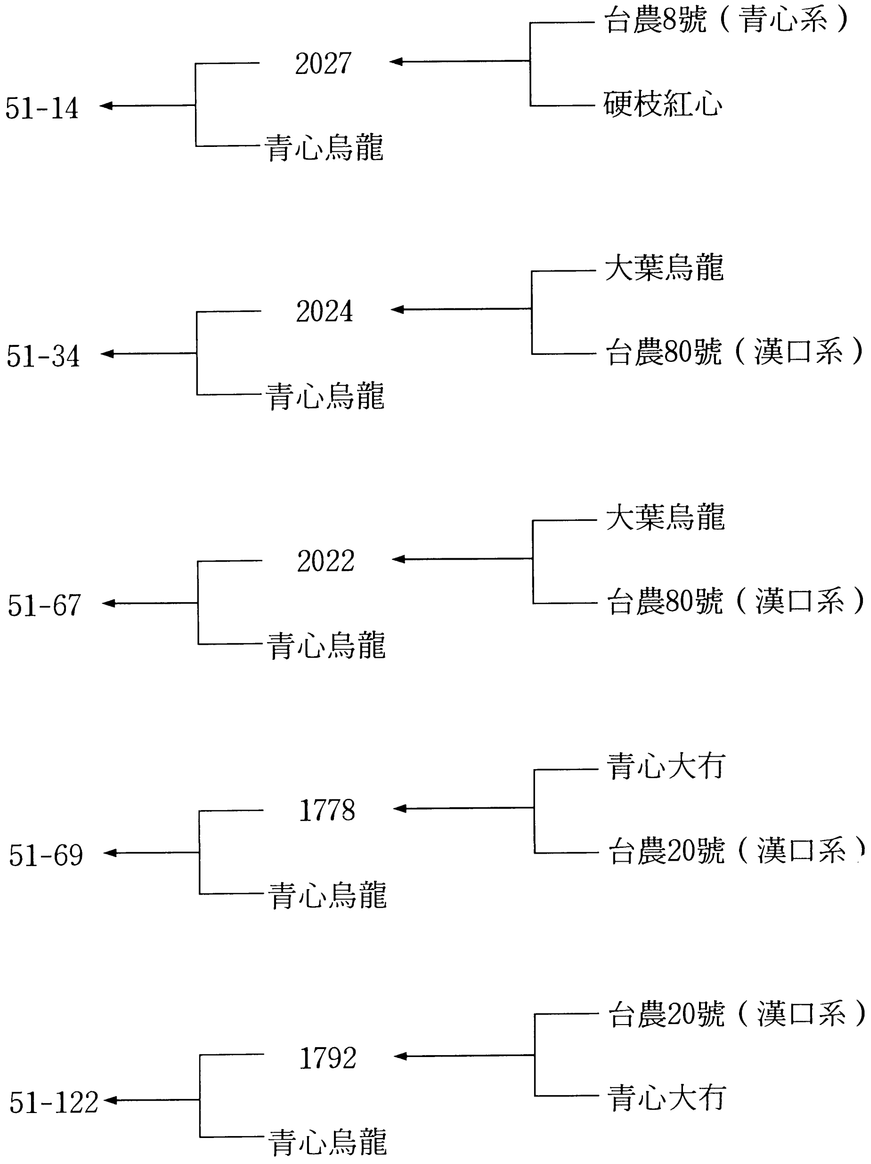
⑷圖譜掃描及聚類分析：

脫色後的膠片，以一般光學掃描器以 256 灰階掃描成圖檔，再以 BIO-PROFIL 1D++ 軟體進行判讀酶譜條帶，並作聚類分析。

結果與討論

在參試的材料上是以 77 年選育部份發酵茶新品系為分析主軸，蓋因其是以青心烏龍為父本的雜交 F_2 後代，如下新品系譜系所示圖，並以其母本及青心烏龍天然雜交種或近緣種作為材料，比較青心烏龍的遺傳行為。

新品系譜系圖



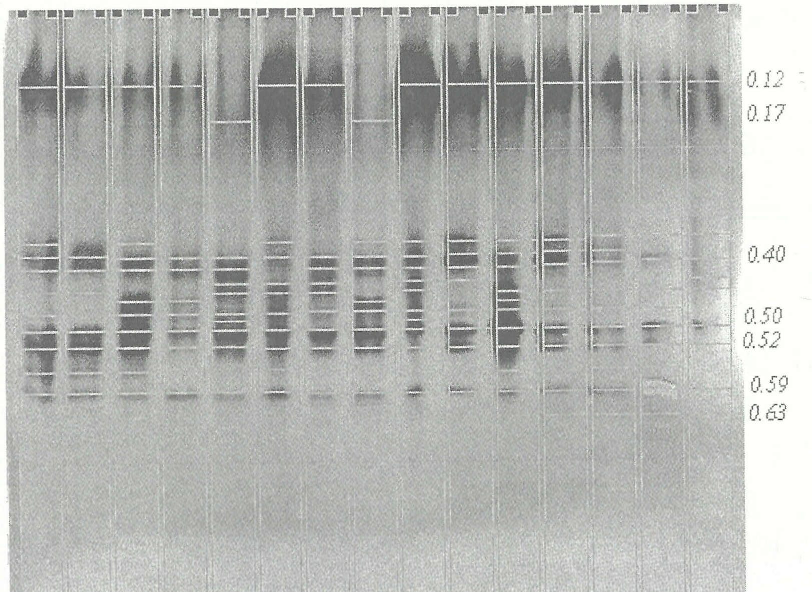
表一、茶樹新品系及對照品種之葉部性狀

Table 1. The leaf characteristcs of new strains and varieties

種系 性狀*	51-14	51-34	51-67	51-69	51-122	台茶12號	青心大冇	青心烏龍
百芽重 (g/100芽)	97.4	112.6	90.4	84.4	79.0	98.8	97.1	69.4
葉面積 (cm2)	12.7	14.5	14.8	11.0	10.2	14.0	11.0	9.9
葉長寬比	2.41	2.45	2.33	2.67	2.78	2.20	2.48	2.65

*三年之調查平均值

由表一新品系及對照品種之葉部性狀分析，其各項值在品種系間的差異不大，且芽色及茸毛多寡亦相似，如借此數值來判別品種系則實屬不易，也易發生誤差[5,17]。



1:51-14, 2:51-34, 3:51-67, 4:51-69, 5:51-122,6:台茶12號,7:青心大冇,8:青心烏龍,9:台茶6號,10:紅心烏龍,11:漢口,12:台茶13號,13:大冇,14:台農8號,15:阿薩姆

圖 1. 茶樹酯同功酶電泳 Rf 圖

Fig 1.Zymogram of easterase isozymes found in leaf of tea plants.

由圖一及表二得知茶樹酯酶同功酶各可出現 16 個不同條帶，各品種系出現條帶有 9 至 13 條不等，其中 Rf = 0.50 、 0.52 、 0.59 、 0.63 條帶出現頻度爲100% ， Rf= 0.12 、0.38、0.40、0.47 條帶出現頻度在 93.3-86.7% 之間，此爲茶樹酯酶同功酶的基本條帶，其中 51-122 及青心烏龍並不具有 Rf = 0.12 的條帶，而出現 Rf= 0.17 的條帶，台茶 12 號沒有 Rf=0.40 條帶，與 51-34 及阿薩姆缺少 Rf=0.47 的條帶較爲特殊。

表二、茶樹酯酶同功酶條帶出現頻度

Table 2. Frequency of esterase isozyme bands of tea plant

帶編號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
帶距離 (Rf)	0.12	0.17	0.33	0.36	0.38	0.40	0.42	0.44	0.45	0.47	0.48	0.50	0.52	0.56	0.59	0.63
出現頻度 (%)	86.7	13.3	6.7	73.3	86.7	93.3	33.3	73.3	26.7	86.7	13.3	100	100	53.3	100	100

Rf=0.36 、 0.44 、 0.56 出現頻度在 73.3 至53.3% 之間，缺少 Rf=0.36 條帶的品種系有 51-34 、 51-69 、 51-122 、青心大有，又 51-69 、 51-122 其親本是由青心大有及台農 20 號正反交產生，由此可得知青心大有或其後代都可能產生此缺帶，可作爲品鑑定之用。缺少 Rf=0.44 條帶的品種系有 51-67 、 51-69 、青心烏龍、紅心烏龍，缺少 Rf=0.56 條帶的品種系有 51-69 、 51-122 、青心大有、青心烏龍，紅心烏龍、台茶 13 號、阿薩姆，由此可見在 51-69 、青心烏龍、紅心烏龍三個品種系中皆無 Rf=0.44 、 0.56 這兩個條帶，顯示青心烏龍在雜交時此酶帶可能與另一親本形成互補帶的作用 [4] 。

特有條帶 Rf0.17 、0.33、 0.42 、 0.45 、0.48 出現頻度則在 40% 以下，Rf= 0.17爲 51-122 及青心烏龍所特有的條帶， Rf= 0.33 只有阿薩姆具有此條帶， 51-122 、台茶 12 號、青心大有、台茶 6 號、紅心烏龍具有 Rf=0.42 條帶，51-67 、 51-69 、青心烏龍、台茶 6 號具有 Rf=0.45 條帶， 51-14 、 51-34 、 51-67、台茶12號、漢口、台茶13號、大有、台農 8 號具有 Rf=0.48 條帶，雖然具有各類特殊條帶，但從電泳圖譜直接作品種系鑑別仍有困難，因此進行其遺傳連鎖群 (Linkage cluster) 之相似程度 (UPGMA) 估算，以分析品種系間之親緣關係 [1] 。

表三、茶樹酯酶同功酶之相似度矩陣數值表 (Neis estimate)

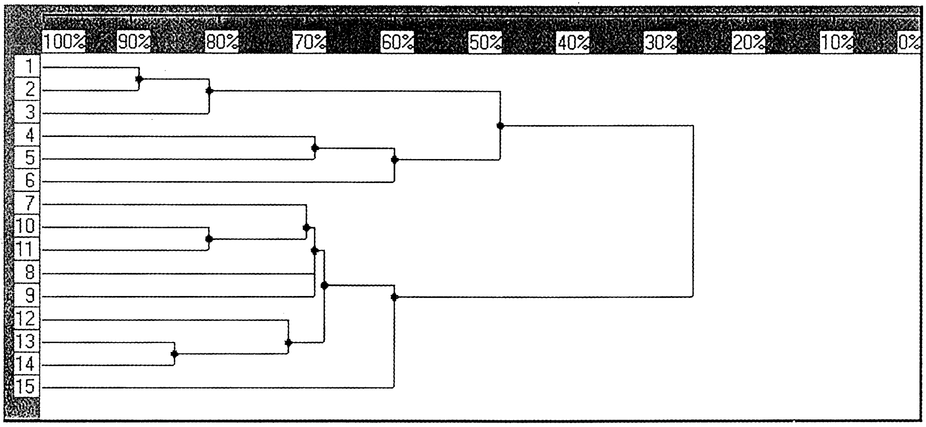
Table 3. Similarity matrix based on Neis estimate of similarity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1															
2	.90														
3	.82	.70													
4	.60	.56	.80												
5	.45	.40	.55	.70											
6	.45	.30	.55	.60	.64										
7	.29	.32	.38	.53	.57	.67									
8	.29	.21	.38	.42	.48	.48	.70								
9	.50	.45	.50	.45	.42	.50	.70	.70							
10	.48	.42	.38	.42	.29	.48	.70	.70	.78						
11	.43	.38	.35	.38	.35	.52	.73	.73	.64	.82					
12	.29	.21	.29	.32	.29	.57	.70	.60	.61	.70	.73				
13	.27	.30	.27	.30	.27	.45	.67	.48	.58	.57	.61	.76			
14	.29	.32	.29	.32	.29	.48	.70	.50	.61	.60	.64	.70	.86		
15	.19	.21	.19	.32	.29	.48	.60	.40	.52	.60	.55	.60	.67	.80	

1:51-14, 2:51-34, 3:51-67, 4:51-69, 5:51-122, 6:台茶12號, 7:青心大冇,8:青心烏龍, 9:台茶6號, 10:紅心烏龍, 11:漢口, 12:台茶13號, 13:大冇, 14:台農8號, 15:阿薩姆

圖 2. 茶樹酯同功酶聚類分析圖

Fig 2. Dendrogram of tea plant listed Table 3, based on average linkage cluster anlysis. Axis on the top of dendrogram indicates percent similarity



經聚類分析其相似度在 40-50% 時，可分爲兩大類群，以青心烏龍爲父本之 F_2 代選育新品系及台茶 12 號爲一類群（ I ），而青心烏龍、青心大冇、漢口及其雜交 F_1 後代爲另一類群（ II ），並顯示以青心烏龍爲雜交父本之 F_2 代，其與青心烏龍、青心大冇、漢口的相似度在 30% 以下。

而在（ I ）類群下可再細分兩次類群，51-14 、 51-34 、 51-67 爲一次類群（ I -1)，其中 51-34 、 51-67 的母本同樣是由大葉烏龍與台農 80 號雜交所選育的品系 2024 、 2022(如新品系譜系圖)，故其 Similarity > 80% ，親緣相似性極高，而 51-69 、 51-122 、台茶 12 號爲另一次類群（ I -2)，其中 51-69 、 51-122 的母本系由青心大冇及台農 20 號正反交所選育出的品系 1778 、 1792(如新品系譜系圖)，故其 Similarity > 70% 。（ II ）類群下可再細分兩次類群，以青心烏龍爲主的（ II -1) 次類群，其中青心大冇、紅心烏龍、漢口較近緣， Similarity > 70%，而台茶 13 號、大冇、台農 8 號則較近緣， Similarity > 70% ，而阿薩姆則自成一次類群（ II -1)。又台茶 6 號、台農 8 號都是由青心烏龍天然雜交所選育的種系，由此聚類圖顯示與青心烏龍的 Similarity > 70% ，且台農 8 號可推測與大冇有近緣關係， Similarity>85% 。

結　論

新品系都以青心烏龍爲父本，而母本多爲漢口系列之雜交子代（如新品系譜系圖），結果其子代親緣偏向台茶 12 號。以 51-14 爲例，其爲台茶 12 號與青心烏龍雜交選育，又台茶 12 號是由台農 8 號及硬枝紅心雜交選育，台農 8 號是由青心烏龍天然雜交所選育，雖經再與青心烏龍雜交，在聚類分析得知與青心烏龍的 Similarity < 50% ，表示子代性狀上與青心烏龍仍有一段差距。因此建議如欲育成與青心烏龍形質相似的品種，如改以青心烏龍及其近緣之品種系，如台茶 6 號、台農 8 號、紅心烏龍等進行雜交，或改以青心烏龍爲母本進行雜交育種，其可能之結果，有待進一步深入探討。

參考文獻

1. 王昭月， 1995 . 同功異構酶與逢機增殖多型性 DNA 標誌在番椒品種鑑別之研究・國立中興大學碩士論文.

2. 李文斌、張映南、劉庚峰、賀善文. 1989 . 柑桔矮化砧及半矮化砧過氧化物酶同功酶及活性的比較. 園藝學報. 16(4):261-265.

3.林文彬、曾夢蛟、倪正柱. 1994 . 台灣野生梨之復育(二)分子標誌鑑定. 中國園藝. 40(4):269-281.

4.陳春林. 1996. 茶樹雜交 F_1 代同功酶分析. 茶葉科學. 16(1):31-36.

5.黃泉源. 1954 . 茶樹栽培學. 台灣省茶業傳習所. pp.67-94.

6.魯成銀、劉爲準、李名君. 1993 . 茶樹起源的同功酶初探. 中國茶葉 4:10-12.

7.蕭順元、章文才、陳吉笙、萬蜀淵. 1989 . 利用同功酶鑑定柑桔雜種與遺傳分析的研究. 園藝學報. 16(4):255-260.

8. Conicella, C., A, F. Saccardo. 1989. Cytogenetic and isozyme studies of wild and cultivated Capsicum annuum. Genome 33:279-282.

9.Degani, C. and A. Blumenfeld. 1986. The use of isozyme analysis for differentiation between loquat cultivars. HortScience 21:1457-1458.

10. Granger, A. R., G. R. Clarke and J. F. Jacjson. 1993. Sweet cherry cultivar identi -fication by leaf isozyme polymorphism. Theor. Appl. Genet. 86:458-464.

11. Kobayashi, R. S., J. L. Brewbaker and H. Kamemoto. 1987. Identification of Anthurium andraeanum cultivars by gel electrophoresis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:164-167.

12. Kennedy, L. S. and P. G. Thompson. 1991. Identification of sweetpotato cultivars using isozyme analysis. HortScience. 26:300-302.

13. Lu, J. and B. Pickersgill. 1993. Isozyme variation and species relationship in peanut and its wild relatives (Arachis L. Leguminosae). Theor. Appl. Genet. 85: 550-560.

14. Shields, C. R., T. J. Orton, and C. W. Stuber. 1983.An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissures, pp. 443-468. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.).Isozymes in plant genetics and breeding, Part A. Elsvier, Amsterdam.

15. Vallejos, C. E. 1983. Enzyme activity staining, p.469-516. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.). Isozyme in plant genetics and breeding, Part A. Elsvier, Amsterdam.

16. Wu, C. T. 1988. Studies on the flush shoot and mature leaf characteristics of the newly registered tea varieties. pp.21-34. In: T. F. Chiu and C. H. Wang (eds.). Recent development in tea production, TTES, Yangmei, Taoyuan, Taiwan, ROC.

17. Xiao, S. Y., W. C. Zhang., J. S. Cheng and S. Y. Wuan. 1995. Inheritance and linkage of isozymes in citrus. Acta Horticulturae. 403:189-197.

Study on the Esterase Isozymes and Species Relationships in Tea Plant

You-zenn Tasi

Summary

The gel electrophoresis was used to analyse the esterase isozymes of the F1 and F2 hybrids of Chin-shin Oolong , Chin-shin Dapang , Hann-koou . There was fifteen species and strains tested. Results showed that total of sixteen bands was detected among them. The different species and strains had eight to thirteen bands. They included eight fundamental bands of Rf = 0.12 , 0.38 , 0.40 , 0.47 , 0.50 , 0.52 , 0.59 , 0.63. The frequency of reproducible bands was above 86.7%. The bands of Rf = 0.36 , 0.44 , 0.56 was 73.3%-53.3%. The bands of Rf = 0.17 , 0.33 , 0.42 , 0.45 , 0.48 was behind 40%.

The Neis genetic distances of tested species and strains were calculated from Rf values on esterase isozymes. Cluster analysis of this matrix produced a dendrogram which could be separated them into two groups. When the similarity was 40 50 %. The F2 of Chin-shin Oolong and TTES 12 was one group. The F1 of Chin-shin Oolong , Chin-shin Dapang , Hann-koou and parents was another group. The similarity between groups was behind 30 %.

Key words : Tea, Esterase, Isozymes, Species Relationsbips.

Substation Dirctor, Associate Agronomist, Wen-Shen Tea Experiment Substation, Taiwan Tea Experiment Station.